

# ストレスと飢餓に対する酵母の応答経路に関する研究

前田 達哉

(東京大学 分子細胞生物学研究所)

## 研究の目的

酵母は物質生産に適した特質を備えた宿主微生物で、発酵や醸造に広く利用されてきた。本研究は、酵母を用いた物資生産プロセスにおいて生産性低下の要因となりうる、ストレスと飢餓に対する応答反応を制御するための基盤の確立を目的として、申請者が研究を進めてきた二つの応答経路のストレス検知ならびに制御機構を解明することを目指して行った。浸透圧ストレス応答性 HOG 経路については、浸透圧ストレスの指標としてセンサーが直接には何をどのようにモニターしているのかを明らかにするため、低浸透圧条件下でも経路が活性される変異株を単離して検討を加えた。飢餓ストレス応答性 TOR 経路については、経路の新しい制御因子を探索することにより新規の制御機構を明らかにした。また、TOR の阻害剤であるラパマイシンに対する感受性の基盤を明らかにすることも目指した。

## 方法

### 浸透圧ストレス応答性 HOG 経路

酵母 two-hybrid 法に用いられる宿主株とベクターにおいて、DNA 結合ドメインに Hog1 を融合することで、浸透圧刺激に応答してレポーター遺伝子を活性化できる<sup>1)</sup>。この株を用い、低浸透圧条件下でも経路が活性される変異体を選択し、原因遺伝子を同定した。抗リン酸化 Hog1 抗体を用いたウェスタン法により経路の活性化を評価した。スフィンゴ脂質生合成系の阻害剤としてミリオシンとオーレオバシジン A を用いた。

### 飢餓ストレス応答性 TOR 経路

申請者が独自に単離した活性化型 TOR 変異体を持つ酵母細胞は、貧栄養条件下でも TOR 経路の活性が適切に低下しないため生育が悪化する。高発現することでこの生育不全を回復させる遺伝子として、経路の負の制御因子を検索した。経路構成因子の局在は、GFP 融合タンパク質を用いて観察した。経路の活性化状態は、主要な基質である Sch9 キナーゼのリン酸化特異抗体を用いたウェスタン法により評価した。ゲノムに誘起される突然変異の頻度は、CAN1 座位についてカナバニン耐性を指標に測定した。

分裂酵母の増殖をカフェインとラパマイシンを種々の濃度で含む培地で検討した。また、TOR に付加したエピソードタグを用いて TOR 複合体を分裂酵母細胞から精製し、4E-BP1 を基質に *in vitro* キナーゼ活性を測定した。このとき、ラパマイシンと GST-FKBP12 を同時に加え、キナーゼ活性のラパマイシン感受性を評価した。

## 結果

### HOG 経路の浸透圧ストレス検知機構<sup>2)</sup>

HOG 経路の活性化をモニターできるレポーター株を親株に、低浸透圧条件下でも経路が活性化される変異株を複数単離した。そのうち、表現型が明瞭で、かつ増殖に関して温度感受性である一株について原因遺伝子を同定したところ、*LCB2* の変異であった。*LCB2* はスフィンゴ脂質生合成経路の初発反応を触媒するセリンパルミトイルトランスフェラーゼのサブユニットをコードしている。この *lcb2* 変異を導入した株は、Hog1 のリン酸化が低浸透圧条件下でも恒常的に昂進していることを確認した。

スフィンゴ脂質生合成系を標的とした阻害剤や生合成遺伝子の欠損株を用いて、複合スフィンゴ脂質レベルの低下が HOG 経路の活性化を引き起こすことを明らかにした。また、エルゴステロール合成の阻害も同様に経路の活性化を引き起こした。スフィンゴ脂質とエルゴステロールは、細胞膜内で集合してラフトと呼ばれる膜領域を形成することが知られている。浸透圧検知に関わるセンサー構成因子 Sln1 と Sho1 は、いずれも界面活性剤耐性膜画分に分布していたため、ラフトに局在していると考えられる。Sho1 のこの分布は、浸透圧ストレスのみならずスフィンゴ脂質レベルの低下によっても増加した。これに対して、同じ条件下で Sln1 の分布に大きな変化は認められなかったが、ネイティブ PAGE における Sln1 の泳動パターンが多量体から単量体へと変化した。

### ストレス顆粒を介した TOR 経路新規制御機構<sup>3)</sup>

ストレス顆粒はストレス刺激に応答して細胞質に一過的に形成される構造体で、翻訳停止した mRNA と翻訳タンパク質の複合体からなっている。その構成因子である Pbp1 の高発現により、TOR 活性が低下することを見出した。そこで、熱ストレスによりストレス顆粒を誘導したところ、TOR 複合体がストレス顆粒へと隔離されることを見出した。熱ストレスにさらされた細胞では一過的に TOR 経路の不活性化が起こることが知られていたが、シクロヘキシミド処理によりストレス顆粒の形成を阻害すると、ストレスからの回復期に TOR 経路の再活性化のタイミングが早まることを見出した。すなわち、ストレス顆粒への TOR 複合体の隔離は、熱ストレスからの回復期に早まった TOR 経路の再活性化を防いでいると考えられる。このことは、ストレス顆粒への隔離が阻害される変異型 TOR 複合体を用いても確認された。また、この機構は、熱ストレスによってゲノムに誘起される突然変異を低く抑える働きをしていることを明らかにした。

### 細胞のラパマイシン感受性の基盤<sup>4)</sup>

酵母（サッカロミセス酵母、*Saccharomyces cerevisiae*）を含む多くの種において、細胞増殖はラパマイシン感受性を示すことが知られている。これに対して、分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）の増殖はラパマイシンで阻害されず、その基盤について興味を持たれてきた。一方で、mTOR のキナーゼ活性を直接阻害する新規の mTOR 阻害剤を用いた解析から、ラパマイシンが mTOR 活性を部分的にしか阻害しないことが最近報告された。そのため、分裂酵母がラパマイシン耐性を示すのは、ラパマイシン処理によっても残存する TOR 活性でも増殖を支持するに十分であるためである可能性がある。まず、分裂酵母の TOR 活性を、*in vitro* キナーゼアッセイで評価したところ、他の生物の TOR と同程度のラパマイシン濃度で阻害されることを確認した。TOR のキナ

一ゼ活性はカフェインによって阻害されることから、ラパマイシン処理によっても残存する TOR 活性をカフェインによりさらに低下させることができると考えられる。実際に、単独では増殖に影響のない濃度のカフェイン存在下において、分裂酵母の増殖がラパマイシンにより阻害されることを見出した。この増殖阻害が、TOR を標的としたものであることを、それぞれの薬剤に耐性の TOR 変異体を用いて確認した。さらに、ラパマイシン処理だけでは誘導することができなかった飢餓応答反応（G1 期停止、飢餓応答遺伝子の転写誘導、オートファジー誘導）が、ラパマイシン+カフェイン処理により誘導された。

## 結論

### HOG 経路の浸透圧ストレス検知機構<sup>2)</sup>

細胞膜のスフィンゴ脂質が HOG 経路の浸透圧検知機構に重要な役割を果たしていた。センサー分子はラフトに局在し、その局在や会合状態が浸透圧によって変化することがストレス検知の基盤であると考えられる。

### ストレス顆粒を介した TOR 経路新規制御機構<sup>3)</sup>

TOR 複合体がストレス顆粒へと隔離され、これが回復期の TOR 経路再活性化のタイミングを決めていることを明らかにした。また、熱ストレスに応答したこの制御は、ゲノムに誘起される突然変異を低く抑える働きを持つことから、さらされたストレスの深刻さに応じて修復と成長とのバランスを取るための機構であると考えられる。

### 細胞のラパマイシン感受性の基盤<sup>4)</sup>

細胞ごとのラパマイシン感受性の違いの基盤は不明であったが、これが TOR 複合体自体の感受性を反映したものでなく、低下した TOR 活性に細胞がどのように反応するかの違いに起因することを分裂酵母において示した。また、TOR 活性によって制御される種々の素過程の間に見られるラパマイシン感受性の違いも、定性的なものではなくて定量的な違いに過ぎないことを明らかにした。

## 文献

- 1) Alepuz, P.M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., and Posas, F. (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.* **22**: 2433-2442.
- 2) Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2012) Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell Biol.* **32**: 2861-2870.
- 3) Takahara, T. and Maeda, T. (2012) Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol. Cell* **47**: 242-252.
- 4) Takahara, T. and Maeda, T. (2012) TORC1 of fission yeast is rapamycin-sensitive. *Genes to Cells* **17**: 698-708.